

CHLORAZOL BLACK E
ALS FARBSTOFF IN DER MEDIZINISCHEN
MYKOLOGIE

THERESIA SCHAECHTL

1988

Disbui. München



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. O. Braun-Falco

CHLORAZOL BLACK E
ALS FARBSTOFF IN DER MEDIZINISCHEN MYKOLOGIE

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Theresia Schaechtl

aus
Weiden

im Jahre

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. med. habil.

M. Dorn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult.

O. Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.1988

Inhalt

1. Einführung

- 1.1 Historisches zur medizinischen Mykologie.....5
- 1.2. Chlorazol Black E - Chemische Grundlagen.....9
- 1.3. Chlorazol Black E in der Literatur.....12
- 1.4. Mikroskopischer Direktnachweis von Pilzen -
Verschiedene Methoden.....16

2. Fragestellung.....20

3. Mikroskopischer Direktnachweis von Pilzen - Anfärbung mit Chlorazol Black E Verschiedene Ansätze der Farblösung im Vergleich

- 3.1. Material und Methode.....22
- 3.2. Versuche.....24
 - 3.2.1. Kaliumhydroxid als Variable.....24
 - 3.2.2. Dimethylsulfoxid als Variable.....26
 - 3.2.3. Chlorazol Black E als Variable.....27
 - 3.2.4. Zugabe von Glycerin.....27

4. Ergebnisse zu 3.

- 4.1. Kaliumhydroxid als Variable.....28
- 4.2. Dimethylsulfoxid als Variable.....29
- 4.3. Chlorazol Black E als Variable.....30

4.4. Zugabe von Glycerin.....	31
4.5. Bestes Mischungsverhältnis der Chlorazol Black E-Lösung.....	31
5. <u>Chlorazol Black E im Vergleich mit Cotton Blue</u>	
5.1. Lactophenol-Farblösung zur Anfärbung von Präparaten der Primärkultur.....	35
5.1.1. Material und Methode...	35
5.1.2. Versuche.....	37
5.2. Polyvinyl-Gemisch nach Koch zur Anfertigung von Dauerpräparaten.....	38
5.2.1. Material und Methode.....	38
5.2.2. Versuche.....	40
6. <u>Ergebnisse zu 5.</u>	
6.1. Lactophenol-Farblösung.....	42
6.2. Polyvinyl-Gemisch nach Koch.....	42
7. <u>Diskussion</u>	45
8. <u>Zusammenfassung</u>	50
9. <u>Literaturangaben</u>	51
10. <u>Danksagung</u>	60
11. <u>Lebenslauf</u>	61

1. Einführung

1.1. Historisches zur medizinischen Mykologie

Als einer der Grundsteine in der Geschichte der Mikrobiologie und damit der Mykologie darf die Arbeit des Italieners Girolamo FRACASTORO gelten, der im 16. Jahrhundert als erster eine folgerichtige, wissenschaftlich fundierte Theorie über das Wesen übertragbarer Krankheiten aufstellt. Er vermutet die Existenz kleiner, vermehrungsfähiger Organismen, die durch direkten oder indirekten Kontakt übertragen werden als Ursache epidemischer Krankheiten. (1,27).

Einem holländischen Amateurwissenschaftler des 17. Jahrhunderts, Antoni VAN LEEUWENHOEK, verdankt die Mikrobiologie grundlegende neue Erkenntnisse. Er macht sich nicht nur um die Weiterentwicklung des Mikroskops verdient, sondern beobachtet auch mit Hilfe des neuen Gerätes zum erstenmal Bakterien. Auch Hefezellen werden von ihm beschrieben. (1,2,18,27).

Die ersten Abbildungen von Mikropilzen zeichnet Robert HOOKE in seinem 1665 erschienen Werk *Micrographia*. Bei Untersuchungen an Rosenblättern, die von der sogenannten "Gelbfleckenkrankheit" befallen sind, entdeckt er 1676 filamentöse Organismen und mutmaßt, den kontagiösen Erreger entdeckt zu haben. (1,2,34,39).

Einige Jahre später, 1679, widmet Marcello MALPIGHI einen großen Teil seines Buches *Anatome Plantarum* den Zeichnungen von Strukturen, die wir heute als Pilze identifizieren. (1,2,27).

Pietro Antonio MICHELI, ein Botaniker aus Florenz bringt 1729 seine Schrift *Nova Plantarum Genera* heraus, die seinen Ruf als überragender Mykologe begründet. Er stellt hier 1900 Pflanzen vor, darunter 900 Pilze und beschreibt als erster Penicillien und Aspergillen. (2,18,34,39).

Ein Rechtsanwalt und Wissenschaftler aus Neigung, Agostino BASSI, beweist 1835, daß die Seidenraupenkalksucht, die viele Jahre die Seidenraupenindustrie in Frankreich und Norditalien schädigt, von einem Pilz verursacht wird. Es handelt sich um eine Botrytisspezies, die später den Namen *Beauveria bassiana* erhält. Erstmals wird hier bewiesen, daß eine Tierkrankheit von einem Mikroorganismus hervorgerufen wird. (1,2,27,34).

Ein Jahr später beschreibt Charles CAGNIARD DE LA TOUR, daß Hefepilze die alkoholische Gärung verursachen. Damit widerlegt er die damals verbreitete, von LIEBIG stammende Theorie, welche die Gärung auf eine "chemische Kontaktwirkung" zurückführt. (1,34).

Mit einer Entdeckung Robert REMAKS beginnt die Geschichte der Humanmykologie. Der Mediziner REMAK findet 1837 in den Favus-skutula eines Kindes Hyphen und Arthrosporen. Er ist der erste, der als Ursache einer menschlichen Krankheit einen Pilz benennt. Er veröffentlicht seine Erkenntnisse jedoch nicht. 1839 gibt REMAKS Lehrer Johann Lucas SCHOENLEIN eine Arbeit heraus, in der er die ätiologische Bedeutung dieser Pilzfäden für den Favus erläutert. REMAK bezeichnet dann 1845 den Krankheitserreger des Favus als *Achorion schoenleinii*. (1,18,34,39).

Diese Forschungsergebnisse sind für die Mykologie richtungsweisend. In den nächsten Jahren werden Pilze als Erreger zahlreicher

bis dahin ungeklärter Krankheiten identifiziert.

1839 entdeckt V. LANGENBECK den "Soorpilz" *Candida albicans*, einen Erreger der Candidose. Die genauen pathogenetischen Eigenschaften dieses Pilzes erläutert 1848 F. T. BERG. (2,36,39).

David GRUBY beschreibt 1841 das *Microsporum audouinii* und das Krankheitsbild einer Trichomykose. (1,2,18,27,34,39).

1846 stellt EICHSTÄDT das *Microsporum furfur* (*Malassezia furfur*) als Ursache der Pytirisias versicolor vor und im Jahre 1854 erkennt BURCKHARDT im *Microsporum minutissimum* (heute als *Corynebacterium minutissimum* klassifiziert) den Erreger des Erythrasma. (18,34,39).

Den Begriff "Mykose" prägt der Berliner Arzt Rudolf VIRCHOW. Er demonstriert 1856 eine Aspergillose innerer Organe und grenzt die Begriffe "Dermatomykose" und "Mykose" (systemische Mykose) voneinander ab. (1,18,34,39).

ISRAEL beschreibt 1878 die Aktinomykose beim Menschen, unabhängig von V. LANGENBECK, der schon 1845 in einem vereiterten Lendenwirbel *Actinomyces*-Drusen gefunden hat. (18,34,39).

In seinem Werk *Sylloge Fungorum* legt SACCARDO 1886 als erster eine geschlossene Systemisierung der Myzeten vor. (2,34).

Um 1890 beginnt Raymond SABOURAND mit seinen mykologischen Forschungen, deren Höhepunkt sein 1910 veröffentlichtes Buch *Les Teignes* darstellt. Er entwickelt und verbessert Nährmedien, die teilweise heute noch verwendet werden und ordnet umfassend die Dermatomyzeten und Dermatomykosen. (1,2,18,27,34,39).

In diese Zeit fällt auch der Beginn der Erforschung der Systemmykosen und ihrer Erreger, wie z. B. 1884 der Cryptococcose durch

BUSSE und BUSCHKE oder 1890 der Nocardiose durch EPPINGER.
(18,34).

Das letzte außerordentliche Ereignis in der Geschichte der Mykologie, das noch als historisch zu werten ist, ist die Entdeckung des Penicillins. Damit beginnt die Ära der myzetogenen Antibiotika. Sir Alexander FLEMING bemerkt 1928 bei Versuchen, daß eine von Schimmel umgebene Streptokokkenkolonie nicht mehr weiterwächst. Er nennt diese Schimmelsubstanz später Penicillin. Dieser Zufallsfund wird lange Zeit nicht wissenschaftlich verwertet. Erst Anfang der vierziger Jahre beschreiben FLOREY und CHAIN den großen therapeutischen Wert des Stoffes und führen die Entwicklung des Mittels weiter. (1,2,18,34).

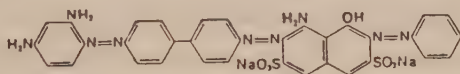
1939 entdeckt man Griseofulvin (OXFORD, RAISTRICK, SIMONART),
1950 Nystatin (HAZEN, BROWN) und 1956 Amphotericin B (GOLD u. a.).
(34).

Nach dem zweiten Weltkrieg nimmt die Häufigkeit von Pilzkrankungen sprunghaft zu und in der mykologischen Forschung ist eine stürmische Entwicklung zu verzeichnen. Heute hat die medizinische Mykologie nicht nur in der Dermatologie, sondern in fast allen medizinischen Fachbereichen entscheidende Bedeutung erlangt.

1.2. Chlorazol Black E - Chemische Grundlagen

Chlorazol Black E ist ein schwarzer, saurer Azofarbstoff, der drei Azo-, drei Amino-, zwei Natriumsulfogruppen und eine Hydroxylgruppe enthält. Benzol- und Naphthalinringe bilden das Grundgerüst.

Strukturformel:



Synonyme:

Direct deep Black E (FIAT); Pontamine black E, EX oder EXX; Erie black GXOO, B, BF; Direct black MS, RL, E, GX, EE 2V, F oder A; Direct deep black EW extra, EA, EAD extra; Renol black G

Bestimmte Gruppen in der Strukturformel von Farbstoffen, sogenannte "Chromophores", sind für die Farbeigenschaften der Stoffe verantwortlich. Chlorazol Black E besitzt als "Chromophore" die Azogruppe ($-\text{N}=\text{N}-$), die basischen Charakter hat. Ein solches "Chromophore" ist zwar farbig, verleiht dem Farbstoff aber noch keine Affinität zu einem Gewebe oder zu Fasern. Er muß also noch zusätzlich eine Gruppe besitzen, die ihm hilft eine mehr oder weniger feste Verbindung mit einem Gewebe einzugehen. Solche Hilfsgruppen heißen "Auxochromes". Dazu gehören auch die Aminogruppe ($-\text{NH}_2$) und die Hydroxylgruppe ($-\text{OH}$).



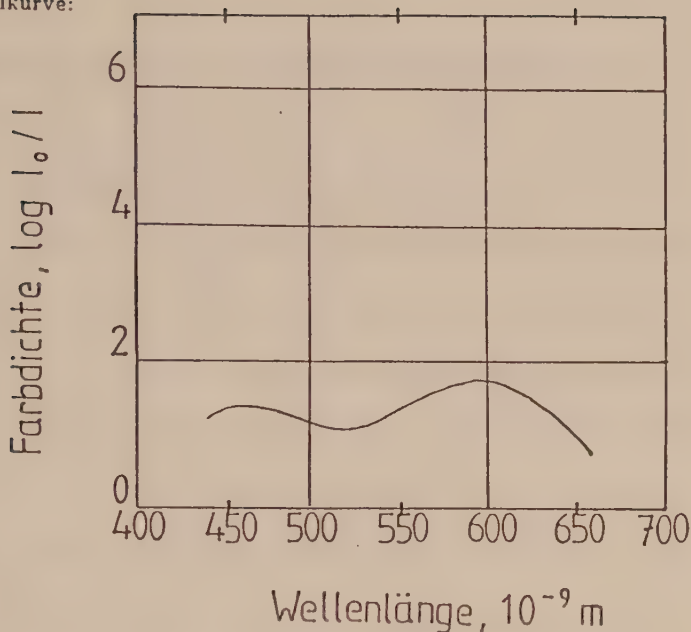
Die Bezeichnung "saurer" Farbstoff bezieht sich nicht auf die H^+ -Ionenkonzentration der gelösten Farbe. Die Einordnung "sauer" oder "basisch" hängt davon ab, ob ausschlaggebende Gruppen in der Verbindung anionisch oder kationisch sind. Eine saure oder anionische Farbe kann in einer Lösung also durchaus basisch reagieren.

Der im Handel erhältliche Farbstoff ist üblicherweise ein Salz, im Falle des Chlorazol Black E ein Natriumsalz.

Die Gruppen, von denen abhängt, ob ein Farbstoff als sauer oder als basisch klassifiziert wird sind gewöhnlich die "Auxochromes".

Die Aminogruppe als "Auxochrome" gibt einer Farbe basischen Charakter, während die Hydroxylgruppe in vielen sauren Farben als "Auxochrome" enthalten ist. Ausschlaggebend für die Zugehörigkeit des Chlorazol Black E zu den sauren Farbstoffen ist jedoch die Sulfogruppe ($-SO_3H$). Diese ist ein sehr schwaches "Auxochrome", besitzt also wenig Fähigkeit den Farbstoff an Gewebe zu binden. Sie hat jedoch einen stark sauren Charakter, der es ihr ermöglicht, auch ursprünglich basische Farben sauer werden zu lassen. Darüberhinaus vermag sie eine Farbe wasserlöslich zu machen. (33).

Spektralkurve:



I_0 = Lichtintensität nach Durchtritt durch das Lösungsmittel
(ohne Farbe)

I = Lichtintensität nach Durchtritt durch die Farblösung

$$I = I_0 \times 10^{-kcd}$$

c = Konzentration der Lösung, in g pro l

d = Dicke der Lösungsschicht, in cm

k = spezifischer Extinktionskoeffizient

Die schwarze Farbe der Lösung zeigt sich in der Spektralkurve durch eine partielle Absorption, die sich durch die ganze sichtbare Farbskala zieht. Nur kleine Spitzen sind vorhanden.
(33).

1.3. Chlorazol Black E in der Literatur

Der erste Bericht über Chlorazol Black E stammt von CANNON aus dem Jahr 1937. Ganz zufällig entdeckt dieser den Farbstoff bei einer biologischen Präparation. Der Alkohol, in dem sich das Arbeitsmaterial befindet, löst etwas Farbe aus dem schwarzen Saftstoff, auf dem präpariert wird. Chitinstrukturen im biologischen Material färben sich damit grün an.

Aus der Stofffarbe wird eine für biologische Zwecke geeignete Farbe entwickelt, welche sich im Laufe von Experimenten als für biologische Färbungen universell verwendbar erweist.

Chlorazol Black E färbt Zellkerne und Chromosomen schwarz, Zytoplasma und eingeschlossene Partikel in verschiedene Grautöne, Glykogen rosa oder rot, Chitin grün. CANNON verwendet wässrige und alkoholische Lösungen. Eine mit Farbe gesättigte Lösung mit 70%igem Alkohol läßt er 15 - 30 Minuten einwirken. Dauerpräparate, die er dem Tageslicht aussetzt, verlieren ihre Farbe auch nach zwölf Monaten noch nicht. Weder Fixieren noch Differenzieren erweist sich als notwendig. (9).

1938 experimentiert DOBELL mit intestinalen Amöben und beschreibt, wie Zysten dieser Darmamöben durch Färbung mit Chlorazol Black E identifiziert werden können. (15).

HARDING berichtet 1939 von biologischen Versuchen, bei denen er Chlorazol Black E in Benzyl-Alkohol gelöst verwendet. (25).

1940 bestätigt DARROW die Versuche von CANNON. Sie benutzt eine 1%ige, gesättigte, ungefilterte Chlorazol Black E-Lösung mit 70%igem Alkohol, die sie 5 - 10 Minuten einwirken läßt. DARROW macht

Experimente an tierischem und pflanzlichem Material und stellt bei ihren Versuchen über die Ergebnisse von CANNON hinaus fest, daß sich Zellwände, Muskelfasern und Lymphozyten schwarz und Blutzellen gelb-grün färben. In den gefärbten Präparaten einer mit einem Pilz infizierten Aster zeigen sich die befallenen Abschnitte und die Hyphen gelb-grün. (14).

Im selben Jahr schreibt NEBEL über eine weitere Verwendungsmöglichkeit von Chlorazol Black E. In Fällen, in denen bei botanischen Experimenten die Darstellung von Chromosomen mit der Azeto-Karmin-Färbemethode nicht befriedigend ist, verbessert eine vorbereitende Behandlung mit Chlorazol Black E die Ergebnisse. Er betont die hohe Zellaffinität der Farbe und ihr relativ stabiles Verhalten in saueren Lösungen. (38).

1941 beschreibt BAKER seine Versuche an lebenden Mäusen. Er injiziert den Tieren subkutan eine wässrige Chlorazol Black E -Lösung. Die Farbe zirkuliert im Blut und zeigt große Affinität zum Retikuloendothelialen System. Sie wird nicht ausgeschieden und so kann das RES bis zur Sättigung beschickt werden. Im Gewebe in der Umgebung der Injektionsstelle färben sich Histiozyten und Fibrozyten stark an. (4).

CANNON veröffentlicht zur gleichen Zeit einen Artikel, in dem er neben anderen neuen Färbungen noch einmal auf Chlorazol Black E eingeht. Er beschreibt die Abhängigkeit der Farbergebnisse vom Lösungsmittel mit dem die Farbe bereitet wird. Äthyl-Alkohol und Benzyl-Alkohol geben unterschiedliche Farbschattierungen. Seine ersten Präparate von 1937 behalten immer noch ihre Farbe. Besonders gut geeignet erweist sich Chlorazol Black E für die

Mikrophotographie, wobei CANNON gelb-grüne Filter verwendet.

(10).

Ebenfalls 1941 experimentieren LEVINE und MORILL mit der Farbe.

Ihre Lösung mit 70%igem Alkohol ist bereits mit 0,5 % Farbe gesättigt. Sie fertigen histologische und zytologische Präparate an, deren verschiedene Gewebeelemente sich schwarz, grün oder gelb-grün färben. Die intensiv schwarze Anfärbung der elastischen Fasern erscheint ihnen besonders bemerkenswert, da bisherige Methoden zu deren Darstellung schwierig und zeitaufwendig sind.

(31).

ARMITAGE weist 1943 auf die Verwendbarkeit von Chlorazol Black E für die histologische Färbung von Mikropilzen hin. Er beschreibt die Verträglichkeit der Farbe mit Lactophenol, einem Aufhellungsmittel, das in der Mykologie allgemein verwendet wird. Junge Hyphen nehmen die Farbe schneller auf als alte, was für die meisten mykologischen Färbungen zutrifft. (3).

Im selben Jahr beschreibt CONN die Anfärbung von Chromosomen in pflanzlichem Material mit einer 1%igen Chlorazol Black E-Lösung. Er verwendet Wasser als Lösungsmittel, womit sich bessere Ergebnisse als mit Alkohol zeigen. Die Chromosomen erscheinen intensiv schwarz gegen hellgraues Zytoplasma und dunkelgraue Nukleoli.

(13).

1944 berichtet SALTHOUSE, daß sich Chlorazol Black E in alkalischen Flüssigkeiten weitaus besser löst als in neutralen wässrigen oder saueren. Er benutzt Ammoniak als Alkali. Bei der tropfenweisen Zugabe von Säure zu einer alkalischen Lösung mit Chlorazol Black E präzipitiert die Farbe allmählich und fällt bei einem

ph-Wert von 5,0 völlig aus. Die Wasserstoffionenkonzentration hat Einfluß auf die Farbergebnisse. Je alkalischer die Lösung ist, um so mehr tendiert die Farbe des Präparates von Grautönen zu graugrün und grün. (44).

1950 erscheint ein von CANNON verfasster Artikel, in dem er sich mit biologischen Färbetechniken auseinandersetzt. Einen großen Raum nimmt die Darstellung von Chlorazol Black E in Kombination mit anderen Farbstoffen ein. (11).

WILCOX und MARSH benutzen 1964 Chlorazol Black E in Verbindung mit Planese III-b, um im Teilungsgewebe von Fichtenwurzeln Pilze zu differenzieren. (52).

1980 erwähnt GEDEK, daß zur Anfärbung von Pilzzellwänden Chlorazol Black E in Kombination mit einem Aufhellungsmittel (Lactophenol oder Chloralhydrat mit Athanol und Essigsäure) verwendet werden kann. Sie macht aber keine genaueren Angaben zu Material oder Methode. (20).

1984 erscheint eine Arbeit von BURKE und JONES, die die Verwendung von Chlorazol Black E für eine neue Färbemethode zum Direktnachweis von Pilzen beschreibt. Diese Veröffentlichung bildet die Grundlage der vorliegenden Abhandlung. (8).

1.4. Mikroskopischer Direktnachweis von Pilzen -

Verschiedene Methoden

Die bei pilzverdächtigem Material vorgenommene mikroskopische Untersuchung unterrichtet gewöhnlich nur darüber, ob im vorliegenden Gewebe oder Ausscheidungsprodukt myzetische Elemente vorhanden sind. Bei positivem Ergebnis können die myzetischen Zellformen Rückschlüsse auf die Klassifizierung des betreffenden Keimes in die drei Pilzgruppen Dermatophyten, Schimmelpilze oder Hefen zulassen. Zur weiteren Differenzierung muß eine Pilzkultur angelegt werden. Bei dem Erreger der *Pyitriasis versicolor* *Malassezia furfur* und dem Erreger der Rhinosporidiose *Rhinosporidium seeberi* ist bislang keine aussagekräftige Züchtung möglich. Der Nachweis wird durch die direkte mikroskopische Untersuchung getroffen.

Ein negatives Ergebnis bedeutet keinen sicheren Ausschluß einer Pilzerkrankung. (5,6,7,16,18,20,24,29,32,34,39,42,43).

Für den mikroskopischen Direktnachweis von Pilzen werden in der Literatur zahlreiche Verfahren beschrieben. Einige auch heute noch relevante sollen hier aufgeführt werden.

Die gebräuchlichste Methode besteht in der Aufhellung der zu untersuchenden Proben mit 10 - 20%iger Kalilauge. Durch das Kaliumhydroxid mazeriert das Zellmaterial des zu untersuchenden Haut-, Nagel- oder Haargewebes und die davon nicht betroffenen, unbeschädigten Pilzelemente treten hervor.

(5,6,7,18,20,24,29,32,34,39,42,43).

Von den Versuchen dieses Verfahren zu verbessern hat sich in der Praxis vor allem die Methode der zusätzlichen Anfärbung mit Parker-Tinte durchgesetzt. Eine bestimmte Tinte der Firma Parker (Superchrome Blueblack Ink) enthält die Farbstoffe 2-Amino-8-Naphtol-2,4-Disulfonsäure und Diaminostilbendisulfonsäure. (17). Die Pilzelemente stellen sich damit dunkelblau dar. (6,12,17,21,29,30,39,46,47,49).

GOMES und EMURA entdecken diesen Farbstoff für die Mikrobiologie und färben damit 1952 bzw. 1953 *Spirochäten (Treponemen)*.

(17,30). COHEN veröffentlicht 1954 einen Artikel, in dem er beschreibt, wie er mit Parker-Tinte *Malassezia furfur* anfärbt.

(12). 1958 erläutert er eine vereinfachte Form seines Verfahrens.

(30). TASCHDJIAN und MUSKATBLIT entwickeln 1953 eine Vorbereitungsmethode für Färbungen. Das in der Praxis übliche Aufweichen des Pilzmaterials in Alkali bewirkt nicht nur die Auflösung des Zellverbandes des umliegenden Gewebes, sondern nach einiger Zeit auch die Zersetzung der Pilzwände. Dies macht eine länger haltbare Färbung der Pilzelemente unmöglich. Durch Neutralisation des Alkali mit Milchsäure nach Aufweichen des Untersuchungsmaterials wird die Zerstörung der Pilze verhindert und jede beliebige Färbung kann angewendet werden. (48). 1955 benutzt TASCHDJIAN ihre Vorbereitungsmethode, um mit Parker-Tinte Dermatophyten, *Candida albicans* und *Nocardia minutissimum* (heute *Corynebacterium minutissimum*) anzufärben. (49).

Viele weitere Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der Parkertintenfärbung und mit Verbesserungsmöglichkeiten für dieses Verfahren. (21,30,46,47). SWARTZ und MEDREK färben ihre Präparate

mit einer Kombination aus Parker-Tinte und dem Farbstoff Rose Bengal und erhalten so einen Kontrast zwischen Pilzen und Hintergrund. Die Pilzelemente erscheinen blau gegen einen rosa bis roten Hintergrund. (47).

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von Pilzen ist die Hautoberflächenbiopsie mit anschließender Färbung. Nach der Methode von GOLDSCHMIDT und KLIGMAN (22) verwenden MARKS und DAWBER Cyanoacrylat-Klebstoffe. Nach dem Auftragen auf die Haut polymerisieren diese in Anwesenheit von Feuchtigkeit rasch und verbinden sich mit dem Stratum corneum. Eine zusammenhängende Hornschicht kann entfernt werden. (35). Angefärbt wird u. a. mit der Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS), nach Gram oder mit einer Lösung aus Parker-Tinte und Kalilauge. (22,35,50).

Die Untersuchung von Nativpräparaten kann auch nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarben erfolgen. Im Fluoreszenzmikroskop zeigen sich die Pilzelemente durch Färbung ihres Zytoplasmas. Hier speichert sich das Fluorochrom. Die Septierung der Hyphen wird durch Aus-sparung der Zellwände sichtbar. (29,39).

Verschiedene histologische Färbeverfahren können ebenfalls für die Anfertigung von Direktpräparaten verwendet werden. Am gebräuchlichsten ist hier die PAS-Färbung. Die Polysaccharide der Zellwände werden von der Perjodsäure in Polyaldehyde überführt. Diese erscheinen nach der Reaktion mit der Schiff-Reagenz (fuchsin-schwefelige Säure) in roter Farbe. So stellen sich die Pilzhypen spezifisch rot dar. (6,39).

Neu und in der allgemeinen Laborarbeit zur Zeit noch nicht üblich ist eine einfach zu handhabende Färbung für den mikroskopischen Direktnachweis von Hautpilzen die im November 1984 von BURKE und JONES beschrieben wird. Sie modifizieren die KOH-Präparation durch Zugabe von Chlorazol Black E. Die Hyphen stellen sich gegen einen grauen Hintergrund grün dar. Ihre Versuche an Hautschuppen, Nägeln und Haaren verlaufen positiv bei Dermatophytosen, Candidosen und *Pytiriasis versicolor*. (8).

2. Fragestellung

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Verwendbarkeit von Chlorazol Black E als Farbstoff in der medizinischen Mykologie.

Zunächst wird untersucht in welchem Mengenverhältnis die Komponenten der von BURKE und JONES (8) für den mikroskopischen Direktnachweis von Pilzen entwickelten Chlorazol Black E-Farblösung zueinander stehen müssen, um möglichst gute Ergebnisse in

- der Aufhellung des Hintergrundes
- der Anfärbung der Pilzelemente und
- der Haltbarkeit des Präparates

zu erzielen.

Weiterhin scheint es für die Routinearbeit im mykologischen Labor interessant zu sein, ob diese Farbe auch noch für andere Färbemethoden verwendet werden kann.

Üblicherweise werden die Präparate für die mikroskopische Untersuchung der Primärkultur mit einer Lactophenol-Cotton Blue-Lösung angefärbt. Die Verträglichkeit von Chlorazol Black E mit Lactophenol beschreibt schon ARMITAGE. (3). Es wird nun untersucht, ob eine Präparation mit einer Lactophenol-Chlorazol Black E -Lösung vergleichbar gute Farbergebnisse liefert.

Das Polyvinyl-Gemisch nach KOCH für die Anfertigung von Dauerpräparaten wird gewöhnlich, falls eine Anfärbung erwünscht ist, ebenfalls mit Cotton Blue hergestellt. (29). Auch hier wird ein Vergleich bezüglich der Farbqualität zwischen Präparaten, die mit einer Cotton Blue-Mischung und solchen, die mit einer Chlorazol Black E-Mischung behandelt wurden, angestellt.

3. Mikroskopischer Direktnachweis von Pilzen - Anfärbung mit

Chlorazol Black E

Verschiedene Ansätze der Farblösung im Vergleich

3.1. Material und Methode

Material:

- Chlorazol Black E (Sigma C1144)

siehe 1.2.

- Kaliumhydroxid (Merck 5033)

KOH

- Dimethylsulfoxid/DMSO (Merck 9678)

C_2H_6OS

- Glycerin etwa 87% reinst (Merck 4091)

$C_3H_8O_3$

- aqua dest.

Methode:

- Herstellung der Farblösung:

Chlorazol Black E wird in Dimethylsulfoxid gelöst. Die Lösung wird nach Zugabe von Kaliumhydroxid mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Farbe ist ohne Filterung sofort verwendbar.

- Herstellung eines mikroskopischen Direktpräparates mit Chlorazol Black E:

Die Anfertigung entspricht der eines üblichen KOH-Direktpräparates. Das zu untersuchende Material wird auf einen Objektträger gebracht und dieser nach Zugabe von zwei bis drei Tropfen Farblösung mit einem Deckglas versehen. Kurzes Erwärmen über einem Bunsenbrenner beschleunigt das Auflösen des Zellmaterials. Hierbei ist übermäßiges Erhitzen bzw. Kochen zu vermeiden, da sonst die Kalilauge schneller austrocknet. Die Färbung selbst jedoch beeinträchtigt der Kochvorgang nicht. Überschüssige Lösung am Rande wird mit Fließpapier entfernt und dabei das Deckglas leicht angedrückt, um das Präparat in möglichst dünner Schicht beurteilen zu können und eventuelle Luftblasen zu entfernen.

- Untersuchung des Präparates unter dem Mikroskop:

Während das KOH-Direktpräparat üblicherweise im abgeblendeten Hellfeldmikroskop betrachtet wird, erfolgt die Begutachtung von Präparaten, die mit Chlorazol Black E angefärbt wurden unter dem aufgeblendeten Mikroskop. Das Aufsuchen der Pilzelemente geschieht bei schwacher Vergrößerung (100 - 200fach), die

genauere Untersuchung bei stärkerer Vergroerung (400fach). (8).

3.2. Versuche

In den folgenden Versuchen werden für jeden Farblsungsansatz sechs Präparate (vier Hautschuppen-, zwei Nagelproben) angelegt. Die Präparate der verschiedenen Lösungsansätze werden nach folgenden Kriterien miteinander verglichen:

- Auflösung und Aufhellung des Hintergrundes
- Anfärbung der Pilzelemente
- Haltbarkeit des Präparates

3.2.1. Kaliumhydroxid als Variable

Die wässerige Lösung des Kaliumhydroxids, die Kalilauge, bewirkt im Schuppen- oder Nagelmaterial die Auflösung des Keratins. Sie läßt es quellen und transparent werden. Die aus Chitin bzw. Zellulose bestehenden Pilzhypen und -sporen bleiben dabei unbeschadet. (5,6,7,16,18,20,24,29,33,34,39,42,43).

Erste Versuchsreihe:

Chlorazol Black E const.	0,012 g
Dimethylsulfoxid const.	1,000 ml
Kallumhydroxid	0,500 g
	0,750 g
	1,000 g
	1,500 g
	2,000 g
	2,500 g
aqua dest. ad	10,000 ml

Zweite Versuchsreihe:

Chlorazol Black E const.	0,012 g
Dimethylsulfoxid const.	1,000 ml
Kaliumhydroxid	1,000 g
	1,500 g
	2,000 g
	2,500 g
aqua dest. ad	10,000 ml

*** im Vergleich gegen ***

Chlorazol Black E const.	0,012 g
Dimethylsulfoxid const.	1,000 ml
Kaliumhydroxid const.	0,750 g
aqua dest. ad	10,000 ml

3.2.2. Dimethylsulfoxid als Variable

Dimethylsulfoxid verlangsamt durch seine ölige Beschaffenheit das Austrocknen des Präparates. Darüber hinaus übt es eine reduzierende Wirkung auf die S-S-Brücken in den Keratinfibrillen der Schuppen oder der Nägel aus. Es entstehen freie SH-Gruppen. Dadurch wird die Auflösung des Zellmaterials beschleunigt.

(20,23,36,41).

Versuchsreihe:

Chlorazol Black E const.	0,012 g
Kaliumhydroxid const.	0,750 g
Dimethylsulfoxid	0,000 ml
	1,000 ml
	2,000 ml
	3,000 ml
	4,000 ml
aqua dest. ad	10,000 ml

3.2.3. Chlorazol Black E als Variable

Versuchsreihe:

Kaliumhydroxid const.	0,750 g
Dimethylsulfoxid const.	1,000 ml
Chlorazol Black E	0,008 g
	0,010 g
	0,012 g
	0,014 g
aqua dest. ad	10,000 ml

3.2.4. Zugabe von Glycerin

Glycerin bewirkt durch seine ölige Konsistenz eine längere Haltbarkeit von Präparaten. (5,24,39,41).

Versuchsreihe:

Chlorazol Black E const.	0,012 g
Kaliumhydroxid const.	0,750 g
Dimethylsulfoxid const.	1,000 ml
Glycerin	1,000 ml
	1,500 ml
	2,000 ml
	2,500 ml
aqua dest. ad	10,000 ml

4. Ergebnisse zu 3.

4.1. Kaliumhydroxid als Variable

- Aufhellung des Hintergrundes:

Mit zunehmender Kalilaugenkonzentration ist eine etwas schnellere Auflösung und Aufhellung des Untersuchungsmaterials zu bemerken.

- Anfärbung:

Bei Werten über 0,750 g KOH läßt die Intensität der Färbung immer mehr nach. Die Pilzhypen erscheinen ähnlich wie im Nativpräparat in grauschwarzer Tönung und gleichen sich der Farbschattierung des Hintergrundes an, was das Auffinden der Hyphen erschwert.

- Haltbarkeit:

Mit steigender Kaliumhydroxidkonzentration setzt die Kristallisation der Lauge und damit die Austrocknung des Präparates früher ein.

Die Versuche werden mit 0,750 g KOH weitergeführt. Dies bedeutet einen Kompromiß zwischen dem schlechteren Aufhellungsvermögen von Farblösungen mit niedrigeren KOH-Konzentrationen und der schlechteren Anfärbung und schnelleren Kristallisation von Farblösungen mit höheren KOH-Konzentrationen.

4.2. Dimethylsulfoxid als Variable

- Aufhellung des Hintergrundes:

Ohne Zugabe von Dimethylsulfoxid zeigt die Lösung ein geringfügig schlechteres Auflösungsvermögen als mit DMSO. Die Präparate mit 1,000 ml und 2,000 ml Dimethylsulfoxid erweisen sich als gleich gut in der Mazerierung des Zellhintergrundes. Mit der Beifügung von 4,000 ml DMSO kann keine Verbesserung mehr erzielt werden.

- Anfärbung:

Die Hyphen zeigen ohne DMSO die gleiche Farbqualität wie mit DMSO. Der Zellhintergrund färbt sich jedoch stärker grau-blau an, was den Kontrast zwischen Hyphen und Zellen abschwächt. Dies erschwert die Beurteilung des Präparates. Bei der Zugabe von 1,000 ml und 2,000 ml Dimethylsulfoxid findet sich ein gleich gutes Ergebnis in der Farbqualität. Das Hinzufügen von 4,000 ml DMSO bewirkt eine schlechtere Anfärbung der Hyphen. Die Pilzelemente erscheinen blasser.

- Haltbarkeit:

Die Präparate ohne Dimethylsulfoxid trocknen rascher aus, als die mit DMSO, da die Kalilauge schneller auskristallisiert. Bei Präparaten mit 1,000 ml und 2,000 ml DMSO ist kein Unterschied in der Haltbarkeit zu bemerken. Eine weitere Erhöhung der DMSO-Konzentration auf 4,000 ml bringt keine Verbesserung mehr.

Bei den weiteren Versuchen wird 1,000 ml Dimethylsulfoxid verwendet.

4.3. Chlorazol Black E als Variable

- Aufhellung des Hintergrundes und Haltbarkeit:

Auf die Haltbarkeit der Präparate und das Aufhellungsvermögen der Lösung haben die variierenden Konzentrationen von Chlorazol Black E keinen Einfluß.

- Anfärbung:

Die Hyphen der Präparate mit 0,008 g und 0,010 g Chlorazol Black E zeigen sich in ihrer Anfärbung nicht so intensiv wie die der Präparate mit 0,012. Der Kontrast zwischen Pilzen und Zellhintergrund schwächt sich dadurch ab. Die Pilzelemente sind schwieriger ausfindig zu machen. Mit der Zugabe von 0,014 g Chlorazol Black E in die Lösung kann keine Zunahme der Farbtintensität mehr bewirkt werden. Allein der Zellhintergrund färbt sich dabei stärker an und erscheint dunkler. Dies verschlechtert wieder den Kontrast zu den Hyphen.

Die Versuche werden mit 0,012 g Chlorazol Black E fortgesetzt.

4.4. Zugabe von Glycerin

- Aufhellung des Hintergrundes und Anfärbung:

Eine Beeinflussung der Farbqualität des Präparates und des Aufhellungsvermögens der Farblösung durch das Glycerin kann nicht festgestellt werden.

- Haltbarkeit:

Die Haltbarkeit der Präparate wird durch die Zugabe von Glycerin erheblich verlängert. Sie sind ohne feuchte Kammer bei offener Aufbewahrung noch nach vier Wochen beurteilbar. Eine Zugabe von 1,500 ml Glycerin ist ausreichend.

4.5. Bestes Mischungsverhältnis der Chlorazol Black E-Lösung

Nach den vorhergehenden Versuchen bringt die Chlorazol Black E-Lösung für die Anfärbung von Direktpräparaten in folgender Zusammensetzung die besten Ergebnisse in der Aufhellung des Hintergrundes, der Anfärbung der Pilzelemente und der Haltbarkeit der Präparate:

Chlorazol Black E	0,012 g
Kaliumhydroxid	0,750 g
Dimethylsulfoxid	1,000 ml
aqua dest. ad	10,000 ml

Die Zugabe von Glycerin ist möglich.

Pilzelemente von Dermatophyten, Candidaarten und *Malassezia furfur* färben sich gleich gut an.

- Aufhellung:

Je nach Dicke des Untersuchungsmaterials benötigt der Zellhintergrund eine gewisse Zeit zur Auflösung und Aufklärung. Bei den vorliegenden Versuchen sind dünne Hautschuppen oft schon unmittelbar nach dem Auftragen der Farblösung beurteilbar. Dicke Schuppen von der Fußsohle oder Nagelproben benötigen dagegen eine Stunde oder mehr Einwirkzeit. Durch erneutes Erhitzen des Präparates über dem Bunsenbrenner wird dieser Vorgang beschleunigt.

- Anfärbung:

Nach Anfärbung des Direktpräparates mit Chlorazol Black E (siehe Abb. 1) erscheinen die Pilzhypen blaugrün. Septen und Zellkerne sind bei entsprechender Vergrößerung gut zu erkennen. Der Zellhintergrund stellt sich in Grautönen dar. Die Hyphen nehmen die Farbe sofort auf, wirken aber nach einigen Minuten Einwirkzeit farbintensiver und klarer. Bei längerer Aufbewahrung in der feuchten Kammer verändert sich die Anfärbung ins Grüngraue.

- Haltbarkeit:

Ohne feuchte Kammer ist ein Präparat zumindest zehn Stunden haltbar. Dann verhindert die Kristallisation der Kalilauge die Beurteilung. In einer feuchten Kammer aufbewahrt, sind Präparate dieser Arbeit noch nach einem Monat begutachtbar (siehe Abb. 2).

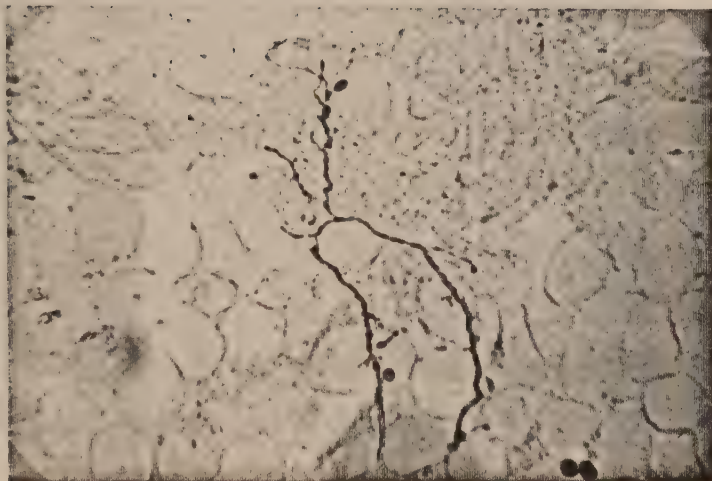


Abb. 1: Direktpräparat, Anfärbung mit Chlorazol Black E, infizierte Hautschuppen (x400).

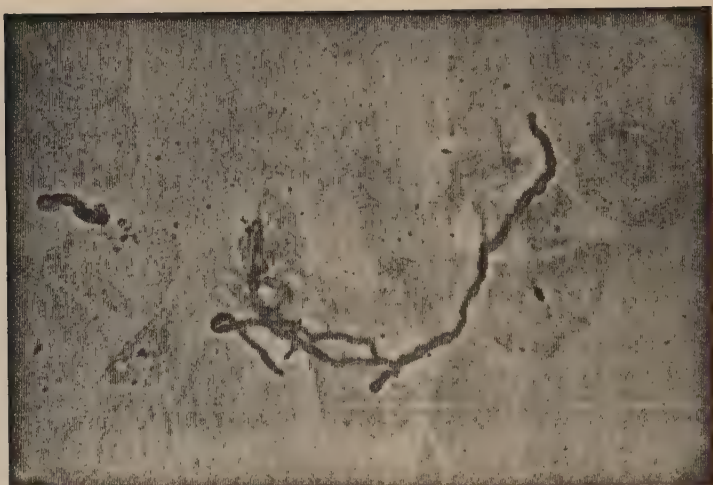


Abb. 2: Direktpräparat, Anfärbung mit Chlorazol Black E, infizierte Hautschuppen, vier Wochen in feuchter Kammer aufbewahrt (x400).

5. Chlorazol Black E im Vergleich mit Cotton Blue

5.1. Lactophenol-Farblösung zur Anfärbung von Präparaten der Primärkultur

5.1.1. Material und Methode

Material :

- Chlorazol Black E (Sigma C1144)

siehe 1.2.

- Cotton Blue (Chroma 10250)

$C_{32}H_{25}N_3O_9S_3Na_2$ blauer, saurer Triphenylmethanfarbstoff (33)

- Milchsäure etwa 90% reinst (Merck 366)

$C_3H_6O_3$

- Glycerin etwa 87% reinst (Merck 4091)

$C_3H_8O_3$

- Phenol/Karbolsäure (Merck 206)

C_6H_5OH

- aqua dest.

Methode:

- Herstellung der Farblösung:

Milchsäure, Glycerin und destilliertes Wasser werden gemischt und nach Zugabe von Phenol leicht erwärmt. Nach der Lösung der Substanzen erfolgt die Zugabe des Farbstoffes. Anschließend wird die Lösung filtriert. (29,39,41).

- Herstellung eines mikroskopischen Präparates der Primärkultur mit der Lactophenol-Farblösung:

Ein mit einer Pinzette oder einem Stäbchen gehaltener durchsichtiger Klebestreifen wird mit der klebrigen Seite nach unten leicht an die Pilzkolonie angedrückt, wobei einige Pilzelemente haften bleiben. Der Streifen wird nun auf einen Objektträger gebracht, auf dem sich zwei bis drei Tropfen Lactophenollösung befinden. (2,15). Die Pilzelemente färben sich in wenigen Minuten an. Überschüssige Farbe wird mit Fließpapier entfernt, wobei der Klebestreifen leicht gegen den Objektträger gepresst wird, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Farbe und ein möglichst planes Aufliegen des Streifens zu erreichen.

- Untersuchung des Präparates unter dem Mikroskop:

Die Begutachtung des Präparates unter dem Mikroskop entspricht der eines mit Chlorazol Black E gefärbten Direktpräparates.

5.1.2. Versuche

Die Versuche werden mit Primärpilzkulturen des *Microsporium canis* durchgeführt. Sowohl mit der Lactophenol-Cotton Blue-Färbung, als auch mit der Lactophenol-Chlorazol Black E-Färbung werden fünfzehn Präparate angelegt und die Farbqualitäten verglichen.

Lactophenol (Milchsäure und Phenol) hellt auf. (39).

Versuchsreihe:

Cotton Blue	0,01 g	
Milchsäure	2,00 ml	
Glycerin	4,00 ml	
Phenol	2,00 g	(wird vor dem Wiegen im
aqua dest.	2,00 ml	Wasserbad geschmolzen)

... im Vergleich gegen ...

Chlorazol Black E	0,01 g
Milchsäure	2,00 ml
Glycerin	4,00 ml
Phenol	2,00 g
aqua dest.	2,00 ml

5.2. Polyvinyl-Gemisch nach Koch zur Anfertigung von Dauerpräparaten

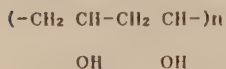
5.2.1. Material und Methode

Material:

- Chlorazol Black E (Sigma C1144) siehe 1.2.

- Cotton Blue (Chroma 10250) siehe 5.1.1.

- Polyvinylalkohol (Sigma P8136)



- Chloralhydrat (Merck 2425)



- Milchsäure etwa 90% reinst (Merck 366)



- Phenol/Karbolsäure (Merck 206)



- Glycerin etwa 87% reinst (Merck 4091)



- aqua dest.

Methode:

- Herstellung des Einschlußmediums :

Der Polyvinylalkohol wird in kaltem, destilliertem Wasser gelöst und das Gemisch im Wasserbad auf 80°C erhitzt bis eine dickflüssige Konsistenz erreicht ist. Falls ungelöste Partikel und Klumpen vorhanden sind wird filtriert. Unter Einhaltung der Reihenfolge erfolgt die Zugabe von Chloralhydrat, Milchsäure, 15%igem Karbolwasser und Glycerin. Nach dem Lösen der Substanzen und anschließender Filtration wird der Farbstoff zugegeben.

- Herstellung eines Dauerpräparates mit dem Koch'schen Einschlußmedium:

Das Einschlußmedium kann für Präparate von Primärkulturen ebenso verwendet werden wie für Nativpräparate.

Das Material wird auf einen Objektträger gebracht. Nach Hinzugabe einiger Tropfen des Gemisches ist eine Einwirkzeit von 30 - 60 Sekunden erforderlich, um den Pilzelementen eine ausreichende Aufnahme der Farbe zu ermöglichen. Nun wird ein Deckglas leicht auf das Präparat gepresst und um dessen Kanten noch etwas Einschlußmedium gegeben, um das Objekt völlig zu versiegeln.

- Untersuchung unter dem Mikroskop:

Die Untersuchung des Dauerpräparates ist der eines mit der Lactophenol-Farblösung behandelten Präparates gleich. (5,18,26,28,29).

5.2.2. Versuche

Mit den beiden Gemischen werden je sechs Nativpräparate und sechs Präparate von Primärkulturen (*Microsporium canis*) angelegt. Die Färbequalitäten der zwei Mischungen werden verglichen.

Chloralhydrat-Lactophenol (Chloralhydrat, Milchsäure und Phenol) hellt auf. (39).

Polyvinylalkohol dehydriert und ergibt ein hyalines, wasserlösliches Einschlußmedium, das resistent gegen Äther, Xylol und Aceton ist. (26).

Versuchsreihe:

Cotton Blue	0,01 g
Polyvinylalkohol	1,00 g
Chloralhydrat	2,00 g
Milchsäure	3,50 g
15%iges Karbolwasser	2,50 ml
Glycerin	1,00 ml
aqua dest.	5,00 ml

... im Vergleich gegen ...

Chlorazol Black E	0,01 g
Polyvinylalkohol	1,00 g
Chloralhydrat	2,00 g
Milchsäure	3,50 g
15%iges Karbolwasser	2,50 ml
Glycerin	1,00 ml
aqua dest.	5,00 ml

6. Ergebnisse zu 5.

6.1. Lactophenol-Farblösung

Die Pilzelemente färben sich mit Cotton Blue intensiv blau an (siehe Abb. 3).

Mit Chlorazol Black E wird ein blaugrüner Farbton erzielt (siehe Abb. 4).

Bei beiden Farbstoffen sind Hyphen, Mikrokonidien und Makrokonidien gut zu erkennen.

Chlorazol Black E ist besser löslich als Cotton Blue und hinterläßt im Filter keinen Niederschlag. Es kann auch ungefiltert verwendet werden.

6.2. Polyvinyl-Gemisch nach Koch

Die Ergebnisse entsprechen denen der Lactophenol-Farblösung. Cotton Blue gibt intensiv blaue und Chlorazol Black E blaugüne Pilzelemente.

Die Löslichkeit von Chlorazol Black E ist in diesem Gemisch etwas schlechter als die von Cotton Blue. Filterung ist, auch wegen des Polyvinylalkohols, in beiden Fällen nötig.

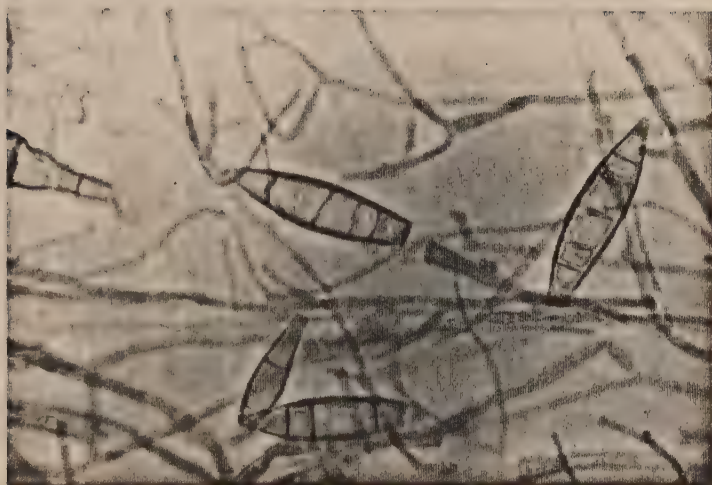


Abb. 4: Lactophenol-Präparat einer Primärkultur (*Microsporum canis*), Anfärbung mit Chlorazol Black E (x400).

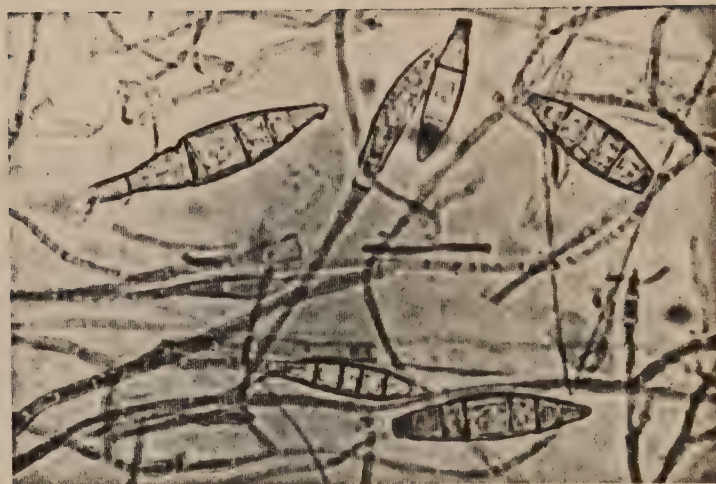


Abb. 3: Lactophenol-Präparat einer Primärkultur (*Microsporum canis*), Anfärbung mit Cotton Blue (x400).

7. Diskussion

Die gebräuchlichsten Methoden zur Herstellung von Präparaten für die mikroskopische Direktuntersuchung zur Diagnose von Pilzinfektionen von Haut, Haaren und Nägeln (siehe 1.4.) sind alle nicht völlig befriedigend, sei es in ihrer Vorbereitung, ihrer Anwendung oder ihren Resultaten.

Die am häufigsten verwendete Methode, die Behandlung des Untersuchungsmaterials mit Kalilauge, ist nicht sehr empfindlich. Die Pilze heben sich nur wenig von der Umgebung ab und sind so, vor allem für den ungeübten Betrachter, manchmal nur schwer ausfindig zu machen. Dies trifft besonders auf Proben zu, die nur vereinzelt Pilzelemente enthalten. (8,29). Weiterhin sind Fehldiagnosen durch Verwechslung von Pilzstrukturen mit Baumwoll-, Pflanzen- und elastischen Gewebsfasern möglich. Auch durch Luftbläschen, Fettröpfchen, Dampfblasen bei zu stark erhitzten Präparaten, sich überlagernde Hornzellgrenzen oder durch Kristallbildungen infolge des KOH, besonders aber durch pilzähnliche Artefakte, sogenannte "Mosaikfungi", die wahrscheinlich durch Verseifung von Lipoiden der Hautoberfläche entstehen, können sich Verwechslungen ergeben. (6,24,29,39).

Die Färbung mit in Alkali gelöster Parker-Tinte wirkt nicht ausschließlich auf die Pilze. Zellstoffteilchen, Wattereste, Baumwollfasern und bei etwas dickerem Untersuchungsmaterial auch die Zellen des Hintergrundgewebes färben ebenfalls blau an. (8,29).

Die Kombination von Parker-Tinte und Rose Bengal ist in ihrer Herstellung sehr aufwendig in Material und Zeit. Zudem sind zufriedenstellende Ergebnisse nur bei feinen Hautschuppen und bei dünnen Nagelgeschabseln, nicht bei dickerem Material zu erreichen. (8,47).

Die Hautoberflächenbiopsie mit anschließender Färbung ist an Nägeln, Handinnenflächen und Fußsohlen, Finger- und Zehenzwischenräumen und an schmieriger oder mazerierter Haut nicht anwendbar. Das Herstellen und Färben eines Präparate ist sehr zeitaufwendig und erfordert viele Hilfsmittel. (8,35,50).

Bei der Verwendung von Parker-Tinte in Kalilauge für die der Biopsie folgenden Anfärbung wird durch das Alkali der Cyanoacrylat-Klebstoff aufgelöst. Auch ist die Aufklärung von dickerem Untersuchungsmaterial bei dieser Methode unzureichend. Bei der Anfärbung nach Gram nehmen in den Epithelzellen bestimmte Körnchen, eventuell Desmosomen, die Farbe ebenfalls auf. (8). Dazu kommt noch, daß die Hautoberflächenbiopsie manchmal ziemlich schmerzhaft sein kann. (8).

Die Untersuchung fluorochromierter Präparate ist nur sinnvoll, wenn eine gute Fluoreszenzeinrichtung vorhanden ist. (29). Für die Routineuntersuchung in der Praxis ist diese Technik zu zeit- und materialaufwendig.

Dasselbe gilt für die histologischen Färbeverfahren. (8).

Die Methode der Anfärbung von Nativpräparaten mit einer alkalischen Chlorazol Black E-Lösung ist preiswert, schnell und einfach zu handhaben. Man muß weder fixieren, noch

differenzieren. Die Lösung behält bei meinen Versuchen ihre Färbeeigenschaften auch noch nach zwölfmonatiger Aufbewahrung. Sie soll nach BURKE und JONES allerdings lichtgeschützt gelagert werden. (8).

Chlorazol Black E färbt das Chitin der Pilzwände ganz spezifisch blaugrün gegen einen Zellhintergrund, der in verschiedenen Grauschattierungen erscheint. BURKE und JONES beschreiben die Farbe der Hyphen als grün. (8). Für die Mikrophotographie eignen sich die Farbtöne gut. Die Pilzelemente sind auch von einem Unerfahrenen im Normalfall schnell und zweifelsfrei zu identifizieren.

Zellkerne und Septen stellen sich klar dar.

In meiner Arbeit werden Hautschuppen und Nägel als Untersuchungsmaterial verwendet. Damit werden bei Dermatophytosen, Candidosen und Pytiriasis versicolor gleich gute Ergebnisse erzielt. BURKE und JONES machen bei gleichen Infektionen zusätzlich Färbungen mit Haaren, die ebenfalls erfolgreich verlaufen. (8).

CANNON berichtet, daß seine Dauerpräparate ihre Farbe auch nach vier Jahren noch nicht verloren haben. (10).

Junge Hyphen färben rascher als alte, was auch bei anderen mykologischen Färbungen der Fall ist. (3,8).

Das Mengenverhältnis der Komponenten der Chlorazol Black E-Lösung, das mir aufgrund meiner Versuche am besten erscheint, weicht nicht sehr von dem von BURKE und JONES ab. Sie verwenden etwas weniger Kaliumhydroxid (5,000 g) und etwas weniger Chlorazol Black E (0,010 g). (8). Da das Chlorazol Black E, das bei meiner Arbeit verwendet wird, von der Herstellerfirma als schwächer in seiner Farbtintensität als die sonst üblicherweise im

Handel erhältliche Farbe deklariert wird, erklärt sich die höhere Konzentration von Chlorazol Black E in meiner Farblösung. Nach BURKE und JONES ist Dimethylsulfoxid für die Mischung nicht notwendig und nur insoweit interessant, als es die Löslichkeit des Farbstoffes verbessert und eine klarere Farblösung liefert. Nach meinen Versuchen bieten die Präparate mit DMSO eine - wenn auch geringfügig - bessere Aufhellung des Hintergrundes. Zudem bleiben sie länger haltbar. Auf die Anfärbung der Hyphen hat das DMSO keinen Einfluß. Die Anfärbung des Hintergrundes tendiert jedoch ohne DMSO ins Graublau, was den Kontrast zu den Hyphen abschwächt. Dies kann an der schlechteren Auflösung des Farbstoffes in der Kalilauge und damit an dem Niederschlag ungelöster Farbpartikel auf dem Präparat liegen. Aus diesen Gründen erscheint mir Dimethylsulfoxid doch für die Qualität der Präparate wichtig.

Die Zugabe von Glycerin zur Verbesserung der Haltbarkeit hat keinen Einfluß auf die Färbeeigenschaften der Lösung. Ohne Glycerin ist ein Präparat offen aufbewahrt ungefähr zehn Stunden, in einer feuchten Kammer gelagert zumindest vier Wochen beurteilbar. Da im mykologischen Labor oder in der Praxis eine feuchte Kammer vorhanden sein dürfte, scheint mir das Hinzufügen von Glycerin in der Regel überflüssig.

Für die alltägliche Arbeit im Labor und in der Praxis ist es praktisch und preiswert, wenn ein Farbstoff für verschiedene Färbemethoden verwendet werden kann.

Die Anwendung von Chlorazol Black E in der Lactophenol-Farblösung

zur Anfärbung von Präparaten der Primärkultur und im Koch'schen Polyvinyl-Gemisch zur Anfertigung von Dauerpräparate ist möglich. Die Pilzelemente erscheinen bei Verwendung der Cotton Blue-Farblösung blau, der Chlorazol Black E-Farblösung blaugrün. Es liegt am Auge eines jeden Betrachters, welche Farbe er bevorzugt. Für mich bringt die intensiv hellblaue Farbe des Cotton Blue die Pilzstrukturen auffälliger und mit mehr Prägnanz zur Geltung, als das Blaugrün des Chlorazol Black E.

8. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht die Tauglichkeit des Farbstoffes Chlorazol Black E für die Diagnostik in der medizinischen Mykologie bzw. zum Nachweis von Hautmykosen.

Eine Chlorazol Black E-KOH-Lösung zur Anfärbung von Nativpräparaten für den mikroskopischen Direktnachweis von Pilzen wird in verschiedenen Zusammensetzungen hergestellt. Die damit angefertigten Präparate werden nach den Kriterien Aufhellung des Hintergrundes, Anfärbung der Pilzelemente und Haltbarkeit verglichen und so das für die Präparatqualität beste Mischungsverhältnis ermittelt.

Die Lösung färbt das Chitin der Pilzwände blaugrün und den Zellhintergrund in verschiedenen Grautönen an. Septen und Zellkerne sind gut zu erkennen.

Chlorazol Black E-KOH eignet sich zur Anfärbung von Hautschuppen, Nagelproben und Haaren bei Dermatophytosen, Candidosen und Pytiriasis versicolor. Die Methode ist herkömmlichen Verfahren in ihrer schnellen und einfachen Handhabung und in ihren Ergebnissen überlegen.

Die Anwendung des Farbstoffes in einer Lactophenol-Farblösung zur Anfertigung von Präparaten der Primärkultur und im Polyvinyl-Gemisch nach Koch zur Herstellung von Dauerpräparaten ist möglich. Die Pilzelemente färben sich blaugrün an. Der bei diesen Methoden üblicherweise verwendete Farbstoff Cotton Blue liefert jedoch im Vergleich zu Chlorazol Black E intensivere und damit deutlichere färberische Ergebnisse.

9. Literaturangaben

- 1 ACKERKNECHT E. (1979).
Geschichte der Medizin.
Enke, Stuttgart
- 2 AINSWORTH G. C., SUSSMAN A. S. (1965).
The fungi. An advanced treatise.
Academic Press, New York/London
- 3 ARMITAGE F. D. (1943).
Further uses for chlorazol black E and a new stain for
botanical sections.
J. R. Microscop. Soc. 63:14-19
- 4 BAKER J. R. (1941).
Chlorazol black E as a vital dye.
Nature 147:744
- 5 BENEKE E. S. (1968)
Medical mycology laboratory manual.
Burgess, Minneapolis
- 6 BRAUN-FALCO O., PLEWIG G., WOLFF H. H. (1984).
Dermatologie und Venerologie.
Springer, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo

- 7 BULMER G. S. (1979).
Introduction to medical mycology.
Year Book Medical Publishers, Chicago/London
- 8 BURKE W. A., JONES B. E. (1984).
A simple stain for rapid office diagnosis of fungus
infections of the skin.
Arch. Dermatol. 120:1519-1520
- 9 CANNON G. H. (1937).
A new biological stain for general purposes.
Nature 139:549
- 10 CANNON G. H. (1941).
On chlorazol black E and some other new stains.
J. R. Microscop. Soc. 61:88-94
- 11 CANNON G. H. (1950).
The technique of biological staining.
Endeavour 9:188-195
- 12 COHEN M. M. (1954).
A simple procedure for staining *Tinea versicolor* (*M. furfur*)
with fountain pen ink.
J. Invest. Dermat. 22:9-10

- 13 CONN J. E. (1943).
Chlorazol black E as a stain for rooting chromosomes.
Stain Technol. 18:189-192
- 14 DARROW M. A. (1940)
A simple staining method for histology and cytology.
Stain Technol. 15:67-68
- 15 DOBELL C. (1938).
Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man.
Parasitology 30:198
- 16 EMMONS CH. W., BINFORD CH., UTZ J. P. (1970).
Medical mycology.
Lea S. Febiger, Philadelphia
- 17 EMURA E. T. (1953).
Rapid and easy method for staining spirochetes with fountain
pen ink.
Arch. Dermatol. 67:210-213
- 18 FEJER E., OLAH D., SZATHMARI S., SZODORAY L., URI J. (1966).
Medizinische Mykologie und Pilzkrankheiten.
Akademiai Kiado, Budapest
- 19 FIESER L. F., FIESER M. (1965).
Organische Chemie.
Verlag Chemie, Weinheim Bergstr.

- 20 GEDEK B. (1980).
Kompendium der medizinischen Mykologie.
Parey, Berlin/Hamburg
- 21 GOLDBERG J. F. (1960).
A rapid method for office diagnosis of candidiasis.
Am. J. Obstet. Gynecol. 80:186
- 22 GOLDSCHMIDT H., KLIGMAN A. M. (1967).
Exfoliative cytology of human horny layer: Methods of cell
removal and microscopic techniques.
Arch. Dermatol. 96:572-576
- 23 GOLDSMITH L. A. (1983).
Biochemistry and physiology of the skin.
Oxford University Press, New York/Oxford
- 24 GRIGORIU D., DELACRETAZ J., BORELLI D. (1984).
Lehrbuch der medizinischen Mykologie.
Hans Huber, Bern/Stuttgart/Wien
- 25 HARDING J. P. (1939).
A simple instrument for dissecting minute organisms.
J. R. Microscop. Soc. 59:19

- 26 HUBER W. M , CAPLIN S. M. (1947).
Simple plastic mount for permanent preservation of fungi and
small arthropods.
Arch. Dermatol. 56:763-765
- 27 IWATA K. (Ed.) (1977).
Recent advances in medical and veterinary mycology.
University Press, Baltimore/London/Tokyo
- 28 KOCH H. A. (1963).
Ein neues Einschlußmedium für mykologische Dauerpräparate.
Mykosen 6:27-28
- 29 KOCH H. (1977).
Leitfaden der medizinischen Mykologie.
Fischer, Stuttgart/New York
- 30 KURANZ R. L. (1964).
Staining of superficial fungi in alkaline preparations.
Stain Technol. 39:95-98
- 31 LEVINE N. D., MORILL C. C. (1941).
Chlorazol black E, a simple connective tissue stain.
Stain Technol. 16:121-122
- 32 LEWIS G. M., HOPPER M. E., WILSON W. J., PLUNKETT O.A. (1958).
An introduction to medical mycology.
Chicago Year Book Publishers, Chicago

- 33 LILLIE R. D. (1969).
H. J. Conn's biological stains.
Williams and Wilkins, Baltimore
- 34 MALE O. (1981).
Medizinische Mykologie für die Praxis.
Thieme, Stuttgart/New York
- 35 MARKS R., DAWBER R. P. R. (1972).
In situ microbiology of the stratum corneum: An application
of skin surface biopsy.
Arch. Dermatol. 105:216-221
- 36 MIER P. D., COTTON D. W. K. (1976).
The molecular biology of skin.
Blackwell, Oxford/London/Edinburgh/Melbourne
- 37 MORTIMER CH. E. (1980).
Chemie.
Thieme, Stuttgart/New York
- 38 NEBEL B. R. (1940).
Chlorazol black E as a aceto-carmin auxiliary stain.
Stain. Technol. 15:69-72
- 39 POLEMANN G., WEGMANN T., STAMMLER A. (1961).
Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten.
Thieme, Stuttgart

- 40 RAUEN H. M. (Hrsg.) (1964).
Biochemisches Taschenbuch.
Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg
- 41 REBELL G., TAPLIN D., BLANK H. (1970).
Dermatophytes. Their recognition and identification.
Dermatology Foundation of Miami, Miami
- 42 RIPPON J. W. (1982).
Medical mycology. The pathogenetic fungi and the
pathogenetic actinomycetes.
W. B. Saunders Company, London/Toronto
- 43 RHODE B., HARTMANN G. (1980).
Mykologie in Beispielen.
Schering, Hamburg
- 44 SALTHOUSE T. N. (1944).
Chlorazol black E in aqueous, alkaline solution.
Stain Technol.19:91-92
- 45 STEIGLEDER G. K. (1983).
Dermatologie und Venerologie.
Thieme, Stuttgart/NewYork

- 46 SWARTZ J. H., LAMKINS B. E. (1964).
A rapid simple stain for fungi in skin, nail scrapings and hairs.
Arch. Dermatol. 89:89-94
- 47 SWARTZ J. H., MEDREK TH. F. (1969).
Rapid contrast stain as a diagnostic aid for fungous infections.
Arch. Dermatol. 99:494-497
- 48 TASCHDJIAN C. L., MUSKATBLIT E. (1953).
Method of staining fungi in cutaneous material after clearing with potassium hydroxide.
Arch. Dermatol. 68:579-582
- 49 TASCHDJIAN C. L. (1955).
Fountain pen ink as an aid in mycologic technique.
J. Invest. Dermat. 24:77-80
- 50 WHITING D. A., BISSET E. A. (1974).
The investigation of superficial fungal infections by skin surface biopsy.
Br. J. Dermatol. 91:57-65
- 51 WIESMANN E. (1982).
Medizinische Mikrobiologie.
Thieme, Stuttgart, New York

52 WILCOX H. E., MARSH L. C. (1964).

Staining plant tissues with chlorazol black E and pianese
III-b.

Stain Technol. 39:81-86

10. Danksagung

Herr Prof. Dr. Dr. O. Braun-Falco ermöglichte mir, diese Untersuchungen an der Dermatologischen Klinik der Universität München durchzuführen. Dafür möchte ich ihm herzlich danken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. M. Dorn, für seine Ratschläge und seine Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein besonders herzlicher Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen des mykologischen Labors Frau K. Fanderl und Frau A. Reindl, die mir bei praktischen Problemen stets hilfsbereit zur Seite standen und meinem Kollegen S. Meyer für seine freundliche und geduldige Unterstützung bei der Schriftsetzung des Textes.

11. Lebenslauf

Name:	Theresia Schaechtl
Geburtsdatum:	25.06.1960
Geburtsort:	Weiden i. d. Opf.
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Georg Schaechtl, Postbeamter Maria Schaechtl, Hausfrau
Geschwister:	Georg Schaechtl, Schreiner und Messerschmied
Familienstand :	ledig
Konfession:	römisch/katholisch
Schul Ausbildung:	1966 bis 1970 Volksschule in Weiden 1970 bis 1977 neusprachlich-humanistisches Augustinus-Gymnasium Weiden 1977 bis 1980 neusprachlich-sozialwissen- schaftliches Elly-Heuss- Gymnasium Weiden 1980 bis 1981 Sprachenschule der Landes- hauptstadt München
Studium:	1981 bis 1987 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München 1987 Approbation

